

LE PRODUIT DE RINCAGE
DE LA REGION PARODONTALE MARGINALE,
ETUDE BIOCHIMIQUE

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Jean-Marc SUDAN

de

BROC (Fribourg)

Thèse N° 316

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545917_0007

LE PRODUIT DE RINCAGE
DE LA REGION PARODONTALE MARGINALE,
ETUDE BIOCHIMIQUE

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine dentaire

par

Jean-Marc SUDAN

de

BROC (Fribourg)

Thèse N° 316

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1974

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Giorgio Cimasoni, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 7 novembre 1974

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 316



Nous désirons adresser au professeur Giorgio Cimasoni nos remerciements les plus reconnaissants pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée dans la direction et l'accomplissement de ce travail.

Nous tenons également à remercier de leur précieuse collaboration :

- Mademoiselle E. Andersen, laborantine
- Mademoiselle R. Wagner, assistante en médecine dentaire
- Mademoiselle N. Léonard, laborantine
- Madame I. Condacci, laborantine
- Monsieur F. Blanc, technicien-dentiste
- Monsieur R. Wiedmer, mécanicien de précision

A MES PARENTS

A GISELE

P L A N

1. Introduction
2. Matériel et méthodes
 - 2.1 Appareillage
 - la gouttière
 - la pompe
 - technique de rinçage
 - 2.2 Méthodes et techniques biochimiques
 - Protéines
 - Acide désoxyribonucléique (DNA)
 - Béta-glucuronidase
 - Phosphatase acide
 - Phosphatase alcaline
 - Cathépsine D
3. Résultats
 - 3.1 Fonctionnement de l'appareil
 - 3.2 Résultats des analyses
4. Discussion
5. Bibliographie

Le présent travail a bénéficié de l'aide financière du
Fonds National de la Recherche Scientifique (No. 3.1660.73)

1. INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, divers auteurs se sont penchés sur l'étude du fluide gingival, dont l'existence a été découverte par Brill (7) en 1958. Dans son travail désormais classique, Brill a injecté de la fluorescéine de sodium à des chiens et a constaté, trente secondes plus tard, l'apparition de fluorescéine dans les sillons gingivaux cliniquement sains. Cette expérience a été effectuée, quelques années plus tard chez l'homme (5).

Plusieurs méthodes ont été proposées et mises au point pour recueillir cet exsudat au niveau du sillon gingivo-dentaire. Brill (4, 5, 6, 8), Winer et coll (30) ont collecté du fluide gingival en insérant des bandes de papier filtre dans le fond du sillon gingivo-dentaire. Valazza (27, 28), reprenant la méthode de Loë et Holm-Pedersen (1965), a placé des bandes de papier filtre à l'entrée du sillon, de façon à ne pas risquer de léser l'attache épithéliale. Sueda (22,23) a utilisé des microtubes de verre qui, placés à l'entrée du sillon, aspiraient, par capillarité, le fluide s'accumulant, après assèchement, au niveau de la zone marginale.

Bien que certains auteurs (Winer et coll, 30; Oppenheim, 19) aient mis en évidence la présence de fluide gingival également au niveau de gencives saines, il semble actuellement évident que ce liquide représente un exsudat inflammatoire que l'on peut collecter seulement en présence d'inflammation gingivale (Brill, 4, 5, 6, 8; Bang et Cimasoni, 2).

En 1963, Takamori (25) étudia la présence de facteurs de croissance du *Lactobacillus* dans le fluide gingival. Il conçut un appareil destiné à recueillir ce fluide: une plaque de résine recouvrait les dents et la gencive en ménageant un espace de 0,5 mm par où pouvait s'écouler l'eau distillée drainant le fluide gingival. Cette solution était ensuite

aspirée au travers de tubes jusque dans une éprouvette. En 1970, Oppenheim (19) a proposé l'utilisation de deux appareils similaires destinés à recueillir sélectivement la salive sous-maxillaire d'une part et le "fluide gingival" (en réalité fluide gingival + matériel bactérien et cellulaire) d'autre part, sans toucher à l'intégrité des tissus marginaux.

Le but du présent travail a été, premièrement, de standardiser la méthode proposée par Oppenheim (19). Il s'agissait d'abord de la construction de l'appareil, appelé plaque ou gouttière palatine, destiné à la collection du produit de rinçage, puis de la mise au point d'un système de pompage qui devait permettre le rinçage de la région parodontale marginale.

Deuxièmement, le but du travail a été de modifier certaines méthodes biochimiques utilisées auparavant pour des microquantités de fluide gingival pur et de les adapter aux quantités de fluide fortement diluées trouvées dans le produit de rinçage.

2. MATERIEL ET METHODES

Un appareil du type de celui de Oppenheim (19) a été mis au point dans le but d'étudier le produit de rinçage du sillon gingivo-dentaire. L'étude a porté sur la confection de la gouttière individuelle pour le maxillaire supérieur, sur la mise au point d'un appareillage nécessaire à obtenir une circulation de liquide et sur les méthodes à employer pour certaines analyses biochimiques du produit de rinçage.

Deux patientes ont été choisies parce qu'elles ne présentaient aucun symptôme de maladie parodontale et parce que l'alignement parfait de leurs dents sur le maxillaire supérieur rendait plus aisée l'insertion de la plaque destinée à la collection de produit de rinçage.

2.1 Appareillage

- La gouttière

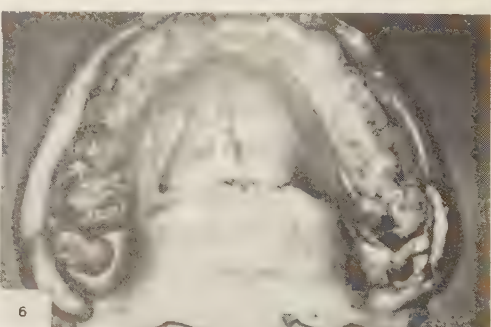
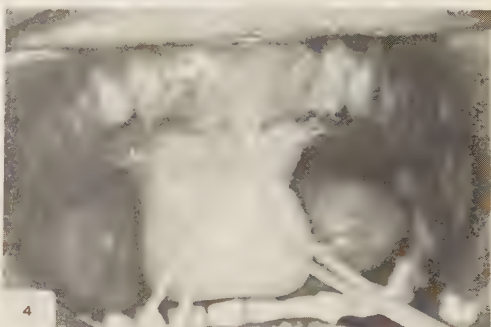
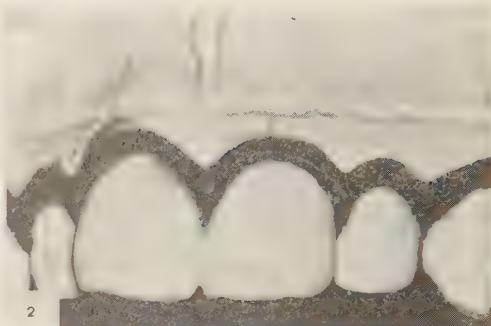
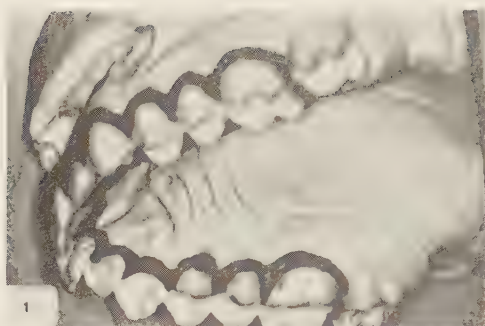
Après la confection d'un porte-empreinte individuel, on a procédé à une prise d'empreinte fidèle du maxillaire supérieur. Cette empreinte devait remonter suffisamment haut dans le vestibule. Le modèle, coulé en plâtre dur, a été ensuite serti d'un cordon de cire d'une épaisseur d'environ 2 mm (fig 1 et 2) qui parcourait, vestibulairement et palatinallement, les collets de toutes les dents, à l'exception des dernières molaires de l'arcade, coiffant ainsi le sillon gingivo-dentaire. Le modèle a été ensuite gratté légèrement sur tout le pourtour vestibulaire, à la hauteur de la gencive attachée, ainsi qu'au niveau du palais, à la hauteur de la limite du palais dur et sur un arc parallèle à l'arcade dentaire. Ces zones grattées ont été recouvertes d'une épaisseur de résine molle autopolymérisante. On a fixé ensuite l'extrémité de 4 tubes de polyvinyl, ayant un diamètre interne de 1 mm, sur le cordon de cire vestibulaire au niveau de la région incisive (entre les dents 11 et 12, et entre

les 21 et 22) et du côté palatin au niveau des régions molaires (entre les dernières et les avant-dernières dents concernées par le cordon de cire (fig. 3). Ces tubes ont été progressivement noyés dans la résine dure autopolymérisante qui venait recouvrir tout le modèle, de façon à sortir de la plaque au niveau de la région antérieure (fig. 4). Finalement ces 4 tubes se rejoignaient deux par deux, suivant leur origine vestibulaire ou palatine, sur deux aiguilles doubles, confectionnées à cet usage. Après son autopolymérisation accélérée dans une cuve d'eau chaude et sous pression d'air, la plaque a été retirée du modèle et nettoyée. La cire a été éliminée pour laisser apparaître un sillon dans la plaque, dans lequel débouchaient les 4 tubes de polyvinyl (fig. 5). Ces derniers ont été sectionnés au niveau du fond du sillon. Dans le but d'assurer une étanchéité parfaite de la gouttière en bouche, on a procédé, au niveau des dernières molaires de l'arcade et sur la limite du palais dur, dans la région du post-dam, à une adaptation fine de la gouttière. Pour ce faire, de l'Impregum (*) a été déposé sur ces endroits, préalablement enduits d'adhésif. La gouttière, ainsi chargée, a été mise et gardée en bouche jusqu'à la prise du matériau; après quoi la gouttière a été retirée et les excès d'Impregum éliminés (fig. 6). En raison de l'instabilité de l'Impregum, il a fallu renouveler périodiquement cette opération afin de conserver toujours parfaite l'étanchéité de la gouttière. Ainsi confectionnée, la gouttière pouvait laisser s'écouler, sous aspiration et à l'abri de la salive, la solution de rinçage dans le chenal créé par le sillon gingivo-dentaire et le sillon de la plaque.

- La pompe

Le système de pompe que nous avons mis au point et utilisé

* ESPE Fabrik pharmazeutischer Präparate GmbH
Seefeld/Oberbayern



Confection de la gouttière

Fig. 1-2 On remarque le cordon de cire d'épaisseur 2 mm qui parcourt le collet des dents en coiffant le sillon gingivo-dentaire, ainsi que les zones où le plâtre a été gratté.

Fig. 3 Les 4 tubes de polyvinyl sont fixés sur le cordon de cire.

Fig. 4 Les 4 tubes ont été noyés dans la résine dure et ressortent dans la région vestibulaire.

Fig. 5 Le sillon apparaît dans la plaque ou gouttière après le nettoyage et l'élimination de la cire.

Fig. 6 On aperçoit la zone du post-dam recouverte d'Impregum.



Fig. 7-8 Le moteur électrique: les 2 seringues, avec leurs aiguilles doubles, sont fixées sur le bloc du moteur et les 2 pistons sont emboîtés sur l'arbre de transmission du moteur.

Fig. 9 Le réseau complet: la plaque, en bouche, est reliée par les 4 tubes aux 2 seringues de façon à fermer le réseau.

pour faire circuler la solution de rinçage dans la plaque est illustré dans les figures 7 et 8.

Nous avons modifié l'extrémité de deux pistons de seringues de 5 cc de façon à pouvoir les emboîter sur l'arbre de transmission d'un moteur électrique, tournant à 2 tours/minute (fig. 7). Les corps des deux seringues de 5 cc ont été fixés sur le bloc du moteur à l'aide de pinces à ressort (fig. 8). La course synchrone et opposée des deux pistons dans les corps des seringues devait assurer une pression sinon négative, du moins nulle dans la circulation de rinçage. En effet, toute pression positive dans le circuit tendait à faire décoller la plaque en bouche et par là à faire perdre l'étanchéité recherchée.

- Technique de rinçage

Pour le rinçage de la région marginale, nous avons utilisé une solution physiologique de NaCl à 0,9 %.

Après avoir été légèrement tempérée dans de l'eau chaude pour ramollir la résine, la gouttière a été insérée en bouche au niveau de l'arcade supérieure préalablement séchée. Le réseau complet en bouche - chenal et tubes - a été d'abord rempli par aspiration (1 ml) : on a connecté une extrémité du réseau, une aiguille double, à la seringue no. 1 en position aspirante, tandis que l'autre extrémité libre a été plongée dans un récipient contenant de la solution physiologique. Le moteur électrique mis en marche, la solution physiologique a été pompée au travers du réseau complet jusqu'à ce qu'une quantité de 5 ml de solution NaCl ait rempli la seringue no. 1 alors en position refoulante. A ce moment on a fermé le circuit en connectant l'extrémité libre à la seringue no. 2 en position aspirante (fig 9).

La solution de rinçage (6 ml) a été ainsi aspirée dans un sens puis dans l'autre, à raison de 4 mouvements d'aspiration

par minute. Sur une durée de 10 minutes, la solution physiologique rinçait donc 40 fois la région parodontale marginale du maxillaire supérieur.

2.2 Méthodes et techniques biochimiques

- Protéines

Pour la détermination de la concentration des protéines totales dans la solution de rinçage, nous avons appliqué la méthode de Lowry et coll (16).

Quatre réactifs ont été préparé: un réactif A contenant 2 % de NaCO_3 dissout dans du NaOH 0,1 N; un réactif B composé de 0,5 % de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ dissout dans 1 % de tartrate de Na; un réactif C contenant 50 ml de réactif A et 1 ml de réactif B (conservable 1 jour); un réactif D contenant du réactif de Folin-phénol dilué en rapport 1 à 3 dans de l'eau.

0,5 ml de solution de rinçage ont été ajoutés dans une éprouvette contenant 2,5 ml de réactif C. Cette solution a été mélangée par agitation, puis laissée reposer pendant 10 min à température ambiante. On a ajouté encore 0,25 ml de réactif D et laissé reposer pendant 30 min. La réduction du réactif de Folin-phénol par les protéines donne une coloration bleue (bleu de molybdène) à la solution finale, dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des protéines. La solution finale a été versée dans la cuve en quartz d'un spectrophotomètre Beckmann DU, pour mesurer l'absorption à la longueur d'onde de 500 nm.

Précédemment, une courbe standard a été établie avec des quantités connues de protéines. Les valeurs, lues au photomètre, ont été rapportées à la courbe standard, donnant la concentration en gr% de protéines.

L'analyse a été menée parallèlement à blanc en utilisant 0,5 ml de H_2O au lieu de la solution de rinçage.

- Acide désoxyribonucléique (DNA)

Pour la détermination de l'acide désoxyribonucléique (DNA), nous avons appliqué une modification de la méthode de Doebner-Miller (14). Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les radicaux aldéhydes de devenir fluorescents lorsqu'ils sont mis en contact avec l'acide diaminobenzoïque (DABA) avec un apport de chaleur et en présence d'acides minéraux.

Avant la véritable procédure de détermination du DNA, nous avons procédé à l'extraction des lipides de la solution à analyser: à 0,2 ml de solution de rinçage, nous avons ajouté 0,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 0,6 N. Ce mélange a été centrifugé pendant 10 min à 2000 tours/min. Environ 0,5 ml de surnageant ont été ensuite retirés et éliminés. Puis nous avons ajouté 1 ml de solution alcoolique 0,1 N d'acétate de potassium et nous avons laissé reposer le tout pendant 10 min à température ambiante. Le mélange a été à nouveau centrifugé et 0,8 ml de surnageant ont été éliminés. Après adjonction de 1 ml d'alcool absolu, l'éprouvette a été couverte de parafilm et chauffée à 60°C pendant 20 min. Le tout a été recentrifugé et 1 ml de surnageant a été retiré. Nous avons encore une fois ajouté 1 ml d'alcool absolu, centrifugé le mélange et retiré tout le surnageant. Finalement le précipité a été séché dans un dessiccateur.

Le précipité, contenant le DNA de la solution de rinçage, a été ajouté à 0,5 ml d'acide diaminobenzoïque, fraîchement préparé (0,3 g DABA pur dans 1 ml HCl 4,0 N). Le tout a été énergiquement agité. Puis, l'éprouvette ayant été recouverte de parafilm, le mélange a été chauffé à 60°C pendant 30 min. 2 ml d'acide perchlorique (PCA) 0,6 N ont été ensuite ajoutés et mélangés.

Simultanément nous avons pratiqué l'analyse avec des quantités standards et décroissantes de DNA de façon à éta-

blir une courbe standard de la fluorescence de l'acide dés-oxyribonucléique.

La fluorescence a été déterminée au fluorimètre avec des filtres de 410 m μ à 495 m μ . La quantité de DNA de la solution de rinçage a été exprimée en μ g/ml.

- Béta-glucuronidase

Pour la détermination de l'enzyme béta-glucuronidase, nous avons appliqué la méthode de Mead (18). Cette méthode est basée sur l'emploi d'un substrat qui, après hydrolyse par l'enzyme, donne un produit hautement fluorescent, le méthylumbelliférone.

Le 4-méthylumbelliréryl-béta-D-glucuronide-hydrate, que nous avons utilisé comme substrat, a été dissout à la concentration 1 mM dans un tampon acétate 0,1 M ayant un pH de 4,6. A 0,05 ml de cette solution de substrat, nous avons ajouté 0,45 ml de la solution de rinçage préincubée durant 5 min à 37°C. Ce mélange a été placé dans un bac à 37°C pour une incubation de 30 min. Après 30 min, la réaction d'hydrolyse a été stoppée par l'adjonction de 2,0 ml d'un tampon glyco-colle (tampon glycine-NaOH) 0,1 M, pH 10,4.

Parallèlement, l'analyse a été menée à blanc: pour ce faire, 0,05 ml de la solution de substrat ont été incubés à 37°C. Après 30 min, nous y avons ajouté 2,0 ml du tampon glyco-colle et 0,45 ml de la solution de rinçage. Dans les deux cas, "analyse" et "blanc", un échantillon de la solution finale a été prélevé et lu au fluorimètre (Aminco-Fluoro-Colorimètre) sous une lumière excitante 364 m μ et avec une lumière émise à 448 m μ .

Précédemment une courbe standard a été établie en fonction de quantités connues et croissantes de méthylumbelliférone (entre 0,001 μ g/ml et 0,1 μ g/ml). La différence entre l'analyse et le blanc a donné la quantité en μ g de méthylumbelli-

férone libéré par ml et par 30 min.

L'activité spécifique de la bêta-glucuronidase a également été calculée par rapport à la quantité de protéines de la solution de rinçage et par rapport à la quantité de DNA.

- Phosphatase acide

La détermination de la phosphatase acide a également été menée par une méthode fluorimétrique (20). Le 4-méthylumbelliféryl-déhydrogène-phosphate, qui a été utilisé comme substrat, a été dissout, à la concentration de 0,1 mM, dans un tampon acétate 0,05 M à un pH de 5,0.

A 0,5 ml de cette solution, nous avons ajouté 0,5 ml de la solution de rinçage précédemment incubée pendant 5 min à 37°C. Ce mélange (substrat et enzyme) a été placé en incubation à 37°C pour une durée de 30 min. Après 30 min, l'incubation a été stoppée par l'adjonction de 1,5 ml de tampon glycocolle (tampon glycine-NaOH) 0,5 M, pH 10,4.

Simultanément, l'analyse a été pratiquée à blanc: le substrat a été incubé seul à 37°C. Après 30 min, 1,5 ml de tampon glycocolle ont été ajoutés, de même que 0,5 ml de la solution de rinçage.

La lecture des solutions finales (analyse et blanc) a été faite au fluorimètre (Aminco-Fluoro-Colorimètre) en utilisant une longueur d'onde de 364 mμ comme lumière excitante et avec une longueur d'onde de 448 mμ comme lumière émise. Une courbe standard (entre 0,01 μg/ml et 1,0 μg/ml) avait précédemment été établie en fonction de quantités connues de méthylumbelliférone. La différence entre l'analyse et le blanc a donné la quantité en μg de méthylumbelliférone libéré par ml et par 30 min.

L'activité spécifique de la phosphatase acide a également été calculée par rapport à la quantité de protéines et de DNA.

- Phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline a également été déterminée grâce à une méthode fluorimétrique (10) : le substrat fluorescent utilisé était, cette fois, le 4-méthylumbelliféryl-déhydrogène-phosphate. Nous avons tout d'abord préparé un tampon ammédiol 0,05 M, pH 8, en dissolvant, dans 1 l d'eau, 5 g de 2-amino-2-méthyl-1,3-propandiol, 1 g de bicarbonate de sodium, 0,15 g de sulfate de magnésium et 2,5 g de carbonate de sodium anhydre. A 0,5 ml de solution de rinçage, nous avons ajouté 0,4 ml de tampon ammédiol, pour une incubation de 5 min à 37°C, puis nous avons ajouté 0,1 ml de substrat à la concentration de 1 mM. Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min. Après 30 min, la réaction a été stoppée par l'adjonction de 1 ml de tampon KH_2PO_4 -KOH, de pH 10,4 et de concentration 1 M.

Parallèlement, l'analyse a été menée à blanc : 0,4 ml de tampon ammédiol ont été préincubés à 37°C pendant 5 min. Puis, nous avons ajouté au tampon préchauffé 0,1 ml de substrat pour une incubation de 30 min, toujours à 37°C. A ce mélange, nous avons enfin ajouté 1,0 ml de tampon KH_2PO_4 -KOH et 0,5 ml de solution de rinçage.

Dans les deux cas, analyse et blanc, un échantillon de la solution finale a été lu au fluorimètre (Aminco-Fluoro-Colorimètre) sous une lumière excitante de 364 mμ et avec une lumière émise de 448 mμ.

Une courbe standard avait été précédemment établie en fonction de quantités connues de méthylumbelliférone. L'activité enzymatique, déterminée par la différence entre l'analyse et le blanc, est exprimée en μg de méthylumbelliférone libéré par ml et par 30 min.

Pour exprimer l'activité spécifique, nous avons rapporté cette différence soit à la quantité de protéines, soit à la quantité de DNA.

- Cathépsine D

La cathépsine D a été déterminée dans la solution de rinçage suivant la méthode de Anson (1).

Cette technique préconise l'utilisation d'hémoglobine comme substrat: 0,2 gr d'hémoglobine bovine ont été mélangés à 10 ml d'une solution 0,1 M d'acide citrique durant 1 heure pour obtenir un pH de 2,2. La solution d'hémoglobine ne devait laisser, après une heure de mélange, aucun dépôt au fond de l'erlenmeyer. Afin d'amener la solution d'hémoglobine à un pH final de 3,5 (pH optimal pour l'activité enzymatique de la cathépsine mammalienne), nous lui avons ajouté, dans une proportion 1:1, du tampon Mac Ilvaine dont le pH était de 4,9. Ce tampon avait été préparé en mélangeant 5 ml d'une solution 0,2 M de Na_2HPO_4 et 5 ml d'acide citrique à la concentration de 0,1 M.

L'analyse de la solution de rinçage a été menée parallèlement à celle d'une solution de contrôle à blanc: 1,5 ml de la solution de substrat au pH de 3,5 (solution d'hémoglobine + tampon Mac Ilvaine) ont été mélangés à 1 ml de la solution à analyser et placés au bain-marie à 37°C pour une incubation de 23 heures. La réaction a été bloquée en ajoutant 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) 0,3 N dont la température était de 4°C. Le TCA cause la précipitation de l'hémoglobine non dégradée par la cathépsine de la solution de rinçage.

En même temps, pour ce qui concerne le "blanc", 1,5 ml de la solution de substrat au pH de 3,5 ont été également placés pour 23 heures au bain-marie à 37°C. Puis on y a ajouté 2,5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à une température de 4°C. Après le traitement de la solution par le TCA, 1 ml de solution de rinçage a été ajouté à ce mélange.

Les solutions finales, "analyse" et "blanc", ont été ensuite filtrées, à la température de 4°C. Les produits de dégradation de l'hémoglobine contenus dans le filtrat des deux

solutions ont été déterminées par absorption dans l'ultra-violet (280 m μ) en utilisant un photomètre Beckmann DU.

L'activité enzymatique a ainsi été déterminée par la différence d'absorption de la solution d'analyse et de la solution de contrôle. Pour obtenir une activité spécifique, cette différence d'absorption a été exprimée soit par rapport à une quantité donnée de protéines, soit par rapport au DNA.

Dans le but de vérifier l'exactitude des méthodes utilisées, nous avons procédé, pour les protéines, pour chaque enzyme et pour le DNA, à une analyse de 6 échantillons prélevés à partir de la même solution de rinçage.

D'un autre côté, nous avons également cherché à vérifier indirectement la précision des méthodes d'analyses en procédant, chez le même sujet, à 3 rinçages successifs pour contrôler si les différents paramètres diminuaient du premier au dernier rinçage.

Finalement, les concentrations des protéines et de DNA ainsi que les activités enzymatiques des enzymes bêta-glucuronidase, phosphatases acide et alcaline et cathépsine D, ont été mesurées dans les produits de rinçage obtenus chez une série de 7 volontaires, dans des conditions d'hygiène buccale optimale.

3. RESULTATS

3.1 Fonctionnement de l'appareillage

La plaque

La plaque palatine, réalisée en résine dure avec un joint périphérique de résine molle a permis d'obtenir une étanchéité parfaite dans le réseau composé du chenal de la plaque et du sillon gingivo-dentaire.

Cette étanchéité a été vérifiée de deux façons:

- la solution de rinçage a été colorée avec du bleu de Méthylène de façon à ce que l'opérateur puisse suivre visuellement son écoulement correct dans le réseau.
- la quantité de solution récupérée (6 ml) après le rinçage a été comparée avec la quantité employée au départ. Après quelques échecs lors des tout premiers rinçages, on a toujours pu recueillir les mêmes 6 ml de solution physiologique employés pour le rinçage.

La pompe

La pompe que nous avons mise au point a permis, par son mouvement d'aspiration et de refoulement synchrone, de maintenir l'étanchéité garantie par la bonne exécution de la plaque palatine.

3.2 Résultats des analyses

Comme nous l'avons expliqué sous "Matériel et méthodes", afin de vérifier la précision des techniques d'analyse, nous avons procédé, pour les protéines, le DNA et pour chaque enzyme, à une détermination menée en même temps sur 6 échantillons prélevés à partir de la même solution de rinçage. Les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau I.

	moyenne	déviati on standard	coefficient de variabilité
protéines (µg/ml)	38,33	0,816	2,1
DNA (µg/ml)	7,5	0,775	10,3
béta-glucur.	0,052 (1)	0,001	1,9
phosph. acide	1,108 (1)	0,061	5,5
phosph. alcaline	0,048 (1)	0,003	6,2
cathépsine D	0,056 (2)	0,004	7,1

Tableau I Concentration des différents composants dans
6 échantillons de la même solution de rinçage.
(1): µg méthylumbelliférone/ml/30 min
(2): différence d'extinction

Nous pouvons remarquer dans le tableau I que les coefficients de variabilité sont tous inférieurs à 10 %, exception faite pour celui concernant la concentration du DNA, ce qui dénote une précision relativement élevée des techniques d'analyse utilisées.

Pour vérifier indirectement l'exactitude des méthodes, nous avons pratiqué, chez le même sujet, trois rinçages successifs. Dans ces trois solutions de rinçage, nous avons déterminé la concentration des protéines et les activités enzymatiques des phosphatases acide et alcaline. Selon notre attente, ces trois paramètres présentaient des valeurs décroissantes, en passant du premier au troisième rinçage.

Chez 7 volontaires masculins entraînés à une hygiène rigoureuse, nous avons pu mettre en évidence les concentrations moyennes des protéines et du DNA, et les activités enzymatiques moyennes des béta-glucuronidase, phosphatases acide et alcaline, cathépsine D, dans le produit de rinçage de la région parodontale marginale. Ces valeurs sont rapportées dans le tableau II.

	moyenne	déviati on standard	coefficient de variabilité
protéines (µg/ml)	160,29	43,99	27,4
DNA (µg/ml)	21,29	15,70	70,9
béta-glucur.	0,0220 (1)	0,00844	38,3
phosph. acide	0,533 (1)	0,333	62,4
phosph. alcaline	0,202 (1)	0,115	56,9
cathépsine D	0,078 (2)	0,0266	32,8

Tableau II Concentrations et activités enzymatiques des divers composants du produit de rinçage chez 7 sujets masculins au parodonte sain.

(1): µg methylumbelliférone/ml/30 min

(2): différence d'extinction

Malgré la précision assez élevée des méthodes utilisées, on peut remarquer que les différents paramètres que nous avons mesurés dans les produits de rinçage présentent une variabilité assez importante d'un individu à l'autre. Comme le montre en effet le tableau II, toutes les moyennes sont caractérisées par une déviation standard proportionnellement très élevée. Dans le cas du DNA, cette variabilité était particulièrement grande, avec un coefficient de variabilité de 70,9 %.

4. DISCUSSION

La plaque dentaire est considérée comme le facteur étiologique premier de la maladie parodontale inflammatoire (Grant, 11; Manson, 17).

La réponse inflammatoire entraînée par la présence de plaque comporte une vasodilatation des capillaires et une perméabilité accrue de l'épithélium crévulaire, ce qui permet l'écoulement d'un exsudat inflammatoire: le fluide gingival (Cimasoni, 9).

Plusieurs méthodes ont été proposées pour recueillir ce fluide. Brill et coll (4, 5, 6, 7, 8) ont mesuré la production de fluide en le collectant sur des papiers filtre insérés dans le fond du sillon gingivo-dentaire. D'autres auteurs ont préféré placer les papiers filtre à l'entrée du sillon pour éviter de traumatiser l'épithélium crévulaire (Loë et Holm-Pedersen, Winer et coll (30), Valazza et coll (27, 28). Sueda et coll (22, 23), Bang et coll (3), Ishikawa et coll (13) ont utilisé des microcapillaires qu'ils plaçaient à l'entrée du sillon.

Dans les travaux que nous venons de citer, le fluide a été collecté soit dans des cas de gingivite et parodontite initiale, soit dans des cas de parodontite avancée. Le but du présent travail, en reprenant l'idée d'Oppenheim (19), a été de mettre au point et de standardiser une méthode de collection du produit de rinçage de la région parodontale marginale dans les cas de gencive cliniquement saine.

Il fallait d'abord des sujets dont l'alignement des dents supérieures soit parfait et rende plus facile la mise en bouche de la plaque.

Quant au problème de l'étanchéité, surtout difficile à obtenir au niveau du joint postérieur, plusieurs tentatives

nous ont amenés à choisir l'Impregum (*) comme matériel idéal pour garantir cette étanchéité...

Les premiers rinçages ont été effectués par un pompage manuel. L'opérateur injectait, avec une seringue, la solution de rinçage dans le tube et le chenal. La solution récupérée était moindre que la solution injectée car la pression positive dans le réseau tendait à faire décoller la plaque et ainsi à perdre l'étanchéité recherchée. Alors nous avons tenté une autre technique à deux opérateurs: l'un injectait par une seringue tandis que l'autre aspirait à l'autre extrémité avec une autre seringue. Après quelques essais plus concluants nous nous sommes aperçus que le piston de la seringue "injectrice" pouvait être aspiré tout seul dans le corps par le mouvement aspirant de l'autre seringue: la pression négative était donc suffisante pour garantir un écoulement sans perte dans le réseau. A partir de cette constatation, nous avons développé et mis au point une pompe à moteur électrique qui pouvait maintenir cette pression négative et ainsi garantir l'étanchéité recherchée.

Le rinçage de la région parodontale marginale nous a rapporté une solution dans laquelle nous avons mis en évidence les protéines totales, le DNA, la bêta-glucuronidase, les phosphatases acide et alcaline et la cathépsine D.

Les protéines déterminées proviennent en partie des cellules épithéliales desquamées, des leucocytes, du fluide gingival, dont la concentration en protéines est semblable à celle du sérum (Bang et Cimasoni, 2), des bactéries et du matériel organique de la plaque. Ne pouvant avoir exactement la même quantité de solution de rinçage d'une fois à l'autre, il nous fallait un élément de référence pour pouvoir comparer entre elles les valeurs trouvées d'activité enzymatique. C'est pour cette raison que nous avons mesuré les protéines

* ESPE Fabrik pharmazeutischer Präparate GmbH
Seefeld/Oberbayern

totales.

Le DNA que nous avons mis en évidence provient vraisemblablement des cellules épithéliales desquamées et des leucocytes qui ont migré hors des capillaires. En effet l'activité mitotique de l'épithélium jonctionnel et crévulaire est plus importante que celle de l'épithélium buccal (Beagrie, 1963). Mühlemann et Hartl (1955), Egelberg (1963) ont démontré que l'inflammation de la région parodontale marginale augmentait la vitesse de renouvellement de l'épithélium gingival. La présence de leucocytes est proportionnelle à l'intensité de l'inflammation (Egelberg, 1963) mais il existe une migration des leucocytes hors des vaisseaux gingivaux dans le sillon, même dans les cas de gencive saine (Egelberg et Attström, 1970; Schroeder, 1970; Schroeder et Listgarten, 1971). La plupart de ces leucocytes présentent des signes de désintégration (Lange, 1967) qui semblent augmenter en fonction de la gravité de l'inflammation (Frank et Cimasoni, 1972). C'est donc pour avoir une image de la quantité de cellules existant dans le produit de rinçage que nous avons recherché quantitativement le DNA, de façon à pouvoir exprimer l'activité spécifique d'enzymes par rapport au DNA, donc aux cellules. Cependant le DNA pourrait avoir également une origine bactérienne.

Dans le produit de rinçage, nous avons déterminé trois enzymes lysosomaux: la phosphatase acide, la bêta-glucuronidase et la cathépsine D.

La phosphatase acide est un enzyme hydrolytique qui a été souvent utilisé comme marqueur lysosomal. Sa présence dans le fluide gingival et dans le produit de rinçage est due à la fois aux bactéries, aux lysosomes des leucocytes (Tyne-lius-Bratthall et Attström, 26) et des cellules épithéliales desquamées (Sueda et Cimasoni, 23). Bien qu'elle se trouve en quantité dix à vingt fois plus élevée dans le fluide gingival que dans le sérum humain (Sueda, Cimasoni et

Held, 24), sa concentration ne semble pas être proportionnellement à la gravité de la gingivite ou parodontite.

La bêta-glucuronidase est également un enzyme hydrolytique. Elle a été mise en évidence, par des méthodes histochemiques, dans les macrophages, les leucocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales provenant de biopsies de gencives saines et enflammées (Goggins et Billups, 1971), et dans les cellules épithéliales desquamées (Lange et Schroeder, 15). Elle est également d'origine bactérienne: Schultz-Haudt et Sherp (21) l'ont identifiée dans des cultures de streptocoques. Elle pourrait jouer un rôle dans l'agression des tissus parodontaux. En effet la concentration de la bêta-glucuronidase dans le fluide gingival semble être en corrélation positive, statistiquement significative, avec la profondeur des poches et le degré de la résorption osseuse (Bang, Cimasoni et Held, 3).

La cathépsine D est un enzyme protéolytique acide. Elle est libérée dans le fluide gingival uniquement à partir des lysosomes mammifères provenant des leucocytes et des cellules épithéliales desquamées (Ishikawa, Cimasoni et Ahmad-Zadeh, 13). Cet enzyme pourrait également avoir une certaine responsabilité dans la pathogénèse de la parodontite: Ishikawa et coll (13) ont en effet trouvé que sa concentration dans le fluide gingival était en corrélation positive et statistiquement significative avec la gravité des lésions parodontales.

A côté de ces trois enzymes lysosomaux, il nous a paru intéressant de mesurer un enzyme non lysosomal: la phosphatase alcaline. Cet enzyme a été trouvé dans les leucocytes (Lange, 1967), dans l'endothélium des petits vaisseaux, dans les fibroblastes et les fibres collagènes (Zander, 1941; Valloton, 1942; Cabrini et Carranza, 1951). La phosphatase alcaline présente dans le fluide gingival provient probable-

ment également des bactéries (Bowen, 1961). Ishikawa et Cima-
masoni (12) ont démontré une corrélation positive, statis-
tiquement significative, entre l'activité de la phosphatase
alcaline dans le fluide gingival et la profondeur moyenne
des poches. D'après Valloton (29) la phosphatase alcaline
pourrait également contribuer au mécanisme de la formation
du tartre.

Le présent travail avait pour but de mettre au point un
appareillage destiné à collecter le produit de rinçage de
la région parodontale marginale, sans qu'il y ait apparem-
ment de lésions du parodonte pouvant fausser l'interpréta-
tion des résultats. Il fallait également standardiser des
méthodes d'analyse biochimique des divers composants du pro-
duit de rinçage.

Cette technique de rinçage devrait permettre de mener des
études longitudinales sur le produit de rinçage de la région
parodontale marginale (fluide gingival + matériel cellulaire
et bactérien) par exemple lors d'une gingivite expérimentale.

5. BIBLIOGRAPHIE

1. ANSON, M.L. The estimation of pepsin, trypsin, pa-
pain and cathepsin with hemoglobin.
J. Gen. Physiol. 22: 79-89 (1938)
2. BANG, J. and CIMASONI, G.
Total protein in human crevicular fluid.
J. Dent. Res. 50: 1683 (1971)
3. BANG, J.; CIMASONI, G. and HELD, A.J.
Beta-glucuronidase correlated with in-
flammation in the exsudate from human
gingiva.
Archs oral Biol. 15: 445-451 (1970)
4. BRILL, N. Influence of capillary permeability on
flow of tissue fluid into gingival
pockets.
Act. Od. Scand. 17: 23-33 (1959)
5. BRILL, N. Gingival conditions related to flow of
tissue fluid into gingival pockets
Act. Od. Scand. 18: 421-446 (1960)
6. BRILL, N. and BJÖRN, H.
Passage of tissue fluid into human gin-
gival pockets.
Act. Od. Scand. 17: 11-21 (1959)
7. BRILL, N. and KRASSE, B.
The passage of tissue fluid into the
clinically healthy gingival pocket.
Act. Od. Scand. 16: 233-245 (1958)
8. BRILL, N. and KRASSE, B.
Effect of mechanical stimulation on
flow of tissue fluid through gingival
pocket epithelium.
Act. Od. Scand. 17: 115-130 (1959)
9. CIMASONI, G. The Crevicular Fluid
Monographs in Oral Science vol 3
Ed. by H.M. Myers S. Karger, Basel (1974)

10. FERNLEY, H.N. and WALKER, P.G.
 Kinetic behaviour of calf-intestinal
 alkaline phosphatase with 4-methylum-
 belliferyl phosphate.
 Biochem. J. 97: 95-103 (1965)

11. GRANT, D.A.; STERN, I.B. and EVERETT, F.G.
 Orban's Periodontics
 Mosby Company, third edition (1968)
 p 121-122

12. ISHIKAWA, I. and CIMASONI, G.
 Alkaline phosphatase in human gingival
 fluid and its relation to periodonti-
 tis.
 Archs oral Biol 15: 1401-1404 (1970)

13. ISHIKAWA, I.; CIMASONI, G. and AHMED-ZADEH, C.
 Possible role of lysosomal enzymes in
 the pathogenesis of periodontitis: a
 study on cathepsin D in human gingival
 fluid.
 Archs oral Biol. 17: 111-117 (1972)

14. KISSANE, J.M. and ROBINS, E.
 The fluorometric measurement of deoxy-
 ribonucleic acid in animal tissues
 with special reference to the central
 nervous system.
 J. biol. 233: 184-188 (1958)

15. LANGE, D.E. and SCHROEDER, H.E.
 Structural localization of lysosomal
 enzymes in gingival sulcus cells.
 J. Dent. Res. 51: 272-278 (1972)

16. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J., FARR, A.L. and RANDALL, J.
 Protein measurement with the Folin phe-
 nol reagent.
 J. biol. Chem. 193: 265-276 (1951)

17. MANSON, J.D.
 Periodontics for Dental Practitioner
 Henry Kompton, London, second edition
 (1970) p. 33-34

18. MEAD, J.A.R.; SMITH, J.N. and WILLIAMS, R.T.
 The biosynthesis of glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorometric determination of beta-glucuronidase.
 Biochem. J. 61: 569-574 (1955)
19. OPPENHEIM, F.G. Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva.
 Helv. odont. Acta 14: 10-17 (1970)
20. ROBINSON, D. and WILLCOX, P.
 4-Methylumbelliferyl phosphate as substrate for lysosomal acid phosphatase.
 Biochem. Biophys. Acta 191: 183-186 (1969)
21. SCHULTZ-HAUDT, S.D. and SHERP, H.W.
 Production of hyaluronidase and beta-glucuronidase by viridans streptococci isolated from gingival crevices.
 J. Dent. Res. 34: 924-929 (1955)
22. SUEDA, T.; BANG, J. and CIMASONI, G.
 Collection of gingival fluid for quantitative analysis.
 J. Dent. Res. 48: 159 (1969)
23. SUEDA, T. and CIMASONI, G.
 The origin of acid phosphatase in human gingival fluid.
 Archs oral Biol. 13: 553-558 (1968)
24. SUEDA, T.; CIMASONI, G. and HELD, A.J.
 High levels of acid phosphatase in human gingival fluid.
 Archs oral Biol. 12: 1205-1207 (1967)
25. TAKAMORI, K.
 The growth stimulating factors for lactobacillus appeared in tissue fluid from gingival crevice.
 Bull. Tokyo med dent Uni. 10: 533-541 (1963)

26. TYNELIUS-BRATTHALL, G. and ATTSTRÖM, R.
 Acid phosphatase, hyaluronidase and protease in crevices of healthy and chronically inflamed gingiva in dogs.
 J. Dent. Res. 51: 279-283 (1972)

27. VALAZZA, A.; MATTER, J.; OGILVIE, A. et CIMASONI, G.
 Fluide gingival, inflammation gingivale, profondeur des poches et perte osseuse.
 RMSO 82: 824-832 (1972)

28. VALAZZA, A.; MATTER, J.; OGILVIE, A. et CIMASONI, G.
 Phosphatase acide, bêta-glucuronidase et cathépsine D dans des microquantités de fluide gingival.
 RMSO 83: 123-132 (1973)

29. VALLOTON, C.F.
 Etude bio-histologique de la phosphatase dans la gencive humaine normale et dans les gingivites.
 RMSO 52: 512-526 (1942)

30. WINER, R.A.; O'DONNELL, L.J.; CHAUNCEY, H.H. and McNAMARA, T.F.
 Enzyme activity in periodontal disease.
 J. Periodont. 41: 449-456 (1970)

